

דוח סופי לתוכנית מחקר מספר 132-1407-09

הדברה ביולוגית באמצעות תבדיד RBL-PC של כימשון, פיתום ו-

Clavibacter michiganense בעגבניות

Biological control of Phytophthora sp., Pythium sp. and *Clavibacter michiganense* in tomatoes by isolate RBL-PC.

מוגש לקרן המדען הראשי, משרד החקלאות

מוגשת על ידי:

עזרא דוד ויגאל אלעד

המחלקה לפתולוגיה של צמחים, וירולוגיה ומדע העשבים,

David Ezra and Yigal Elad, Department of Plant Pathology and Weed Research, ARO, the Volcani Center, P.O.Box 6 Bet Dagan, 50250 Israel; dezra@volcani.agri.gov.il

ספטמבר 2012

תשרי תשע"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/ לא

חתימת החוקר _____

תקציר

הצגת הבעיה:

העגבנייה הינה צמח חד-שנתי, עשבוני, ממשפחת הסולנניים (Solanaceae), פרי העגבנייה הינו מרכיב חשוב במזונו של האדם והוא נאכל חי או מבושל ומעובד בתעשיית המזון. בתנאי האקלים בישראל ניתן לגדל את העגבניות לאורך כל השנה. את צמחי העגבנייה תוקפות מחלות שונות הנגרמות על ידי וירוסים, פטריות וחיידיקים, מהחשובות שבהן נמנות הכימרון (Phytophthora sp.), ריקבון רך מפיתיום (Pythium sp.) והמחלה הבקטריאלית "מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבנייה". כיום ההתמודדות עם מחלות אלה היא בעיקרה שימוש בחומרי ריסוס מדכאי פטריות ומגוון אמצעים אגרוטכניים כגון השקיה במועדים מסוימים הרחקת חומר צמחי נגוע, אוורור החממות וכדומה. לאחרונה בוצעו מחקרים שבדקו את האפשרות לפיתוח ממשק יעיל להתמודדות עם המחלות גם באמצעים המתאימים לשיטת גידול אורגנית. חשיבות מחלות אלה הינם חשיבות כלכלית בעיקרה שכן הנזק הנגרם על ידי פטריות וחיידיק זה משמעותו השמדה כמעט מוחלטת של הצמחים ו/ או הפרי. ההתמודדות עם מחלות אלה בחקלאות האורגנית הינה משימה קשה עוד יותר שכן החומרים המאשרים לשימוש אינם יעילים דיים. הדברה ביולוגית של מחלות שונות מהווה אחד הפתרונות המאשרים בחקלאות האורגנית. בעבודה שבוצעה במעבדתנו נמצאה פטרייה אנדופיטית המפרישה חומרים הקוטלים פתוגנים אלה באופן ספציפי. היפותזת העבודה שלנו היא שניתן להשתמש בפטרייה זו להתמודדות והדברת גורמי מחלות אלה.

מטרות המחקר ושיטות עבודה לתקופת הדוח: מטרת המחקר הכללית הינה פיתוח כלי להדברת המחלות בחקלאות אורגנית המשוועת לפתרונות הדברה. בנוסף, אמצעי זה יוכל לשמש גם בחקלאות הקונבנציונלית. מטרת המחקר הספציפיות לתקופת הדוח: 1. בירור השפעת מיצוי החומרים המשנים המופרשים על ידי הפטרייה על הדבקות והתפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי על עגבניות. 2. בידוד, זיהוי ואפיון החומרים הפעילים במיצוי.

תוצאות עיקריות לתקופת המחקר: השפעת החומרים המופרשים על ידי הפטרייה על התפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי (קלויבקטר משיגנסיס): נמצא כי ריסוס המיצוי על הצמחים הפחית את הנגיעות במחלה בצמחי העגבנייה בהשוואה לביקורות. אנו מסיקים כי ריסוס החומרים המופרשים על ידי הפטרייה יכולים להוות מדבירים טבעיים למחלת הכיב הבקטריאלי בריסוס. אפיון החומרים הפעילים בתערובת המיצוי: משמונה חומרים שהראו פעילות ביולוגית בתערובת המיצוי, זוהו שלושה. מתוך שלושה חומרים אלה נמצא חומר אחד פעיל שאראה פעילות כנגד פיטיום וקלויבקטר במבחני מעבדה. נתונים כימיים מפורטים בדוח.

מסקנות והמלצות: יש להמשיך ולבחון את השפעת החומר שבודד וזוהה על צמחים שלמים בחממות ובתי גדילה ובתנאים חצי מסחריים.

מבוא

מחלת הכימשון גורמת לכמישת הצמח כולו, בפירות העגבנייה מופיע ריקבון קשה בצבע ירוק עד חום כאשר גורמי מחלה משניים מנצלים ריקבון זה לחדירה וכתוצאה מתקבל ריקבון רך. המחלה גורמת לפחיתה רבה ביבול. כיום ההתמודדות עם מחלה זו היא בעיקרה שימוש בחומרי ריסוס מדכאי פטריות ומגוון אמצעים אגרוטכניים כגון השקיה במועדים מסוימים הרחקת חומר צמחי נגוע אורור החממות וכדומה. *Clavibacter michiganense* הינו חיידק פתוגני, גרם חיובי, המתיישב בקסילים. סימפטומים מופיעים בדרך כלל בצמחים בוגרים אף על פי שההדבקה יכולה להתרחש כבר בנבטים מזרעים נגועים. בשטח, הסימפטומים מתחילים בהתייבשות קצוות העלים ונמשכים להתייבשות של הצמח כולו ואח"כ מתרחשים נבילה, שינוי צבע בצינורות ההובלה ועוד. הפירות בצמחים נגועים לא מבשילים או מבשילים באופן לא אחיד. הנזק הכלכלי ממחלה זו עצום ומגיע לעיתים לפחיתה של 70% ויותר ביבול. מאז גילוי גורם המחלה ב 1910 בארה"ב ועד היום התפשטה המחלה לכל העולם וגורמת לנזקים משמעותיים בכל אזורי גידול העגבניות. הטיפול במחלה מתחיל בשימוש בזרעים נקיים מגורם המחלה. זרעים כאלה מתקבלים על ידי טיפול בחומצה או דרכים אחרות המשמידות את גורם המחלה. ברגע שהמחלה מתגלה בשטח יש לבצע הרחקה של צמחים חולים בכדי למנוע את המשך התפשטות המחלה. על ניקוי זה להיעשות בזהירות מירבית בכדי למנוע הפצה של חלקי צמח הנושאים את גורם המחלה לשאר השטח. אין תכשירים יעילים כנגד המחלה והחיידק נחשב על ידי ה EPPO כחיידק הסגר מסוכן ביותר. מחלת הפיתום גורמת למחלות ריקבון רך בנביטה בקרקעות או זרעים נגועים. לאחר הצצת הנבט, המחלה מתבטאת בעיקר בריקבון שורשים ולעיתים אף בחיגור הנבט ומותו. מינים מסוימים של פיתום תוקפים גם צמחים בוגרים וגורמים לריקבון בצמח ולפגיעה בפרי. הטיפול במחלה הוא בעיקרו שימוש במדכאי פטריות.

במסגרת עבודת מחקר המבוצעת במעבדתנו ועיקרה חיפוש אחר מיקרואורגניזמים אנדופיטים מעצי פרי, בעלי פעילות כנגד פיטופתוגנים איתרנו מספר פטריות וחיידקים אנדופיטים בעלי פוטנציאל לשמש בבקרה ביולוגית. אחת מפטריות אלה, תבדיד RBL-PC, בודדה מדוגמאות שנאספו מצמח בשם *Polygonum cuspidatum* שמקורו מיפאן וסין ונדגם בגן הבוטאני של אוניברסיטת תל אביב. תבדיד זה הינו פעיל ספציפית כנגד *Clavibacter michiganense* ו-*Pythium spp.* תסנין מצע הגידול שלה הורג את החיידק *Clavibacter michiganense* באופן ייחודי ולא חיידקים אחרים כגון *Xanthomonas campestris* *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*. נמצא שהפטרייה מפרישה חומר שהינו פעיל בריכוזים נמוכים. היות ופטרייה זו בודדה כאנדופיט נראה שהיא תוכל להתמקם ולגדול בצמחים בעלי עניין חקלאי ובייחוד כאלה הסובלים ממחלות הנגרמות על ידי הפטריות והחיידק שנמצאו רגישים לתבדיד זה ובייחוד עגבנייה המהווה גידול חשוב מאוד בחקלאות האורגנית והקונבנציונלית והידועה כרגישה ביותר לפתוגנים אלה. לאור העובדה שהאפשרויות להדברה של גורמי מחלות בחקלאות האורגנית הינה מוגבלת ומאחר והיקף השימוש בנחשת המשמשת להדברתם במגמת הצטמצמות יש הכרח מידי במציאת חומרים חדשים, ידידותיים, העומדים בדרישות החקלאות האורגנית ובכללם מדברים ביולוגיים. אנו מאמינים ביתרונם של מדברים ביולוגיים אנדופיטים כיוון שפטריות וחיידקים אלה ממוקמים בתוך הצמח, מוגנים מחומרי הדברה המרוססים על פני הצמח כגון תכשירי נחשת וגופרית. ברוב המקרים הידועים הם גם מתקיימים בשלום עם מדברים ביולוגיים אחרים כגון אלה המבוססים על מיני בצילוס וטריכודרמה.

מטרות המחקר לתקופת הדוח הן:

1. בירור השפעת ריסוס מיצוי החומרים המופרשים על ידי הפטריה על הדבקות והתפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבניות.
2. בידוד, זיהוי ואפיון החומרים הפעילים במיצוי.

עיקרי הניסויים לתקופת הדו"ח

בירור השפעת ריסוס מיצוי החומרים המופרשים על ידי הפטריה על הדבקות והתפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבניות.

מיצוי הפטרייה התקבל מגידול הפטרייה במצע נוזלי PDB למשך כשבועיים ולאחר מכן מיצוי בעזרת כלורופורם. החומרים מוצו בכלורופורם הומסו באתנול והוספו בריכוזים ידועים למצע מזון אליו הועברו גם פיטופטורה, פיטיום והחיידק CMM. ועל פי מסת הגדילה של המיקרואורגניזמים הנבחנים נקבעה עוצמת העיכוב. המיצוי הורחף בשלב הבא בתערובת אתנול:מים (70% אתנול) ורוסס על צמחוני עגבנייה בני שבוע עד שבועיים. בזמנים שונים הצמחונים הודבקו בתרחיף החיידק בריכוז 10^8 cfu/ml. ההדבקה בוצעה על ידי פציעת הצמח בנקודת חיבור של העלה אל הגבעול והנחת טיפה בנפח 10µl המכילה תרחיף חיידקים. תסמינים התקבלו כ-10 עד 20 ימים לאחר ההדבקה. בניסויים נבחנה עוצמת המחלה על הצמחים לאחר ריסוס בתרחיף המיצוי כאשר הצמחים רוססו 16 שעות לפני ההדבקה, הודבקו מיד לאחר ריסוס הצמחים, הודבקו אך רוססו בתרחיף המיצוי 16 שעות ו-24 שעות לאחר מכן.

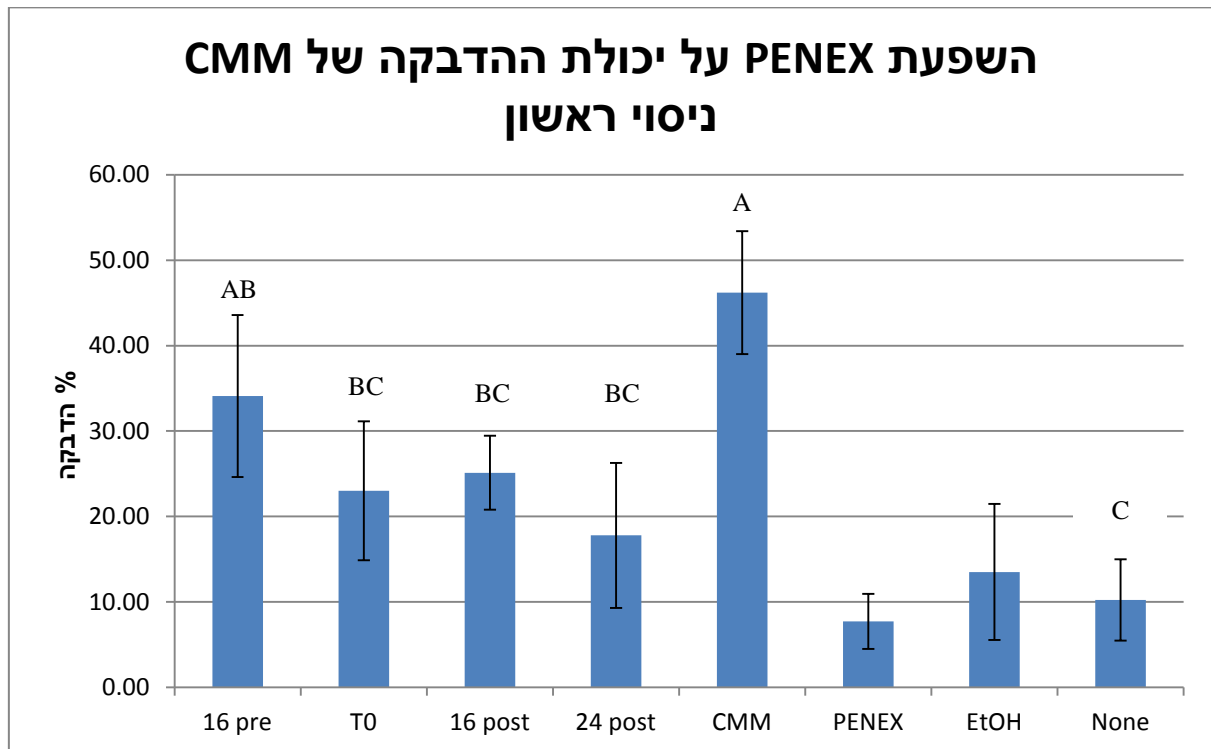
הניסויים בוצעו פעמיים.

מבנה הניסוי היה של 3 צמחים בשלוש חזרות בשני ניסויים שונים כל חזרה מוקמה באקראי בשטח הניסוי.

עוצמת המחלה נקבעה על ידי הערכת נגיעות בכלל הצמח כחידה.

בניסוי הראשון התוצאות שהתקבלו מראים מגמה ברורה של השפעת הריסוס על תסמיני המחלה בצמחים שבניסוי (גרף 1). עם זאת ניתן לראות כי בביקורות הניסוי, ריסוס המיצוי בלבד ללא הדבקה בחיידק (PENEX) לבחינת הפיטוטוקסיות של המיצוי על הצמח, EtOH לבחינת ההשפעה הפיטוטוקסית של החומר הנושא –אתנול (המיצוי הורחף בתערובת אתנול מים ביחסים של 70% אתנול ו-30% מים) וצמחים שלא טופלו כלל, ישנה רמה מסויימת של תסמיני מחלה. אנו משערים שתסמינים אלה הינם תוצאה של הדבקה בלתי מכוונת שהתרחשה בן הצמחים באופן טבעי. לאחר מעשה אנו יודעים כיום כי היה חשוב להרחיק יותר את הצמחים בניסוי ובמיוחד את הביקורות זה מזה. עם זאת ניתן לראות בתוצאות המוצגות בגרף 1 כי ביקורת צמחים מודבקים ללא ריסוס המיצוי (CMM) מראה את רמת ההדבקה הגבוהה ביותר בניסוי בעוד ריסוס במועדים השונים מפחית את רמת התסמינים. ניתן לראות שריסוס המיצוי 24 שעות לאחר ההדבקה, 16 שעות לאחר ההדבקה או בזמן ההדבקה מפחיתים את התסמינים המתקבלים לאחר 20 ימים ב-23 עד 30 אחוז. אף על שהתוצאות המובאות לא מראות הבדלים סטטיסטיים בהפחתת התסמינים בניסוי הריסוס 16 שעות לפני ההדבקה ניתן לראות שישנה מגמת הפחתה בתסמינים. גם במקרה זה אנחנו משערים שהתרחשה הדבקה בן הצמחים במועד מאוחר יותר שאחראית על הפחתת עוצמת ההשפעה של

המיצוי על הופעת התסמינים בצמחים. נקודה נוספת שיש להביא בחשבון היא העובדה שהריסוס ניתן פעם אחת בלבד במהלך הניסוי בזמנים המצויינים. אם השערתנו שהיתה הדבקה חוזרת בן הצמחים במועדים מאוחרים יותר נכונה, יתכן וריסוס נוסף היה מונע הדבקה שניה זו ומפחית את רמת התסמינים שאנו רואים בסיכום ניסוי זה. לשם בחינת השערה זו יש לבצע ניסוי בו יבוצע הניסוי המתואר בדיוק באותו אופן אך הצמחים ירוססו שוב במועדים שונים במהלך האינקובציה בבית הגידול.



גרף 1. השפעת ריסוס מיצוי החומרים המופרשים (PENEX) מהפטרייה האנדופיטית RBL-PC בזמנים שונים, על הופעת תסמיני מחלת הכיב הבקטריאלי בצמחי עגבניה מודבקים.

בשימוש במבחן student T test נמצאו הבדלים מובהקים בן הביקורות (CMM ו-None) והטיפולים (מלבד טיפול ה 16 שעות לפני). האותיות השונות בגרף מיצגות הבדלים מובהקים בן הטיפולים ברמת מובהקות $\alpha = 0.05$

בניסוי נוסף שבוצע בדיוק באותו אופן התקבלו תוצאות המראות את אותה מגמה בהופעת התסמינים אך ההבדלים בהופעת תסמינים בטיפול הריסוס 24 שעות לאחר ההדבקה והופעת תסמינים בביקורת הפיטוטוקסיות של המיצוי מול ביקורת ההדבקה בחיידק היו קטנים יותר מהמוצג בניסוי זה (תוצאות לא מוצגות).

בידוד, זיהוי ואפיון החומרים הפעילים במיצוי הפטרייה.

מיצוי מצע הגידול של הפטרייה (כ 10 ליטר מצע גידול) בוצע על ידי סינון הפטרייה מהמצע דרך שכבה כפולה של פד גאזה סטרילי, הוספת נפח שווה של כלורופורם, עירבוב אגרסיבי של התמיסה והעברתה ל"פאנל הפרדה" והנחתה עד להפרדות שתי הפאזות: המימית (מצע) והכלורופורמית המכילה, על פי נסיון העבר שלנו, את החומרים הפעילים שהופרשו על ידי הפטרייה. הפאזה הכלורופורמית הועברה לכלי נקי בעוד הפאזה המימית עברה מיצוי

כלורופורמי פעמיים נוספים. הפאזה הכלורופורמית משלושת המיצויים אוחדה והכלורופורם נודף ממנה על ידי שימוש ב"אופוראטור" תוך שימוש בחימום קל (42 מ"צ) והפעלת וואקום. לאחר נידוף הכלורופורם מהתמיסה החומרים הממוצים נשארו בכלי הנידוף, משם הם הועברו לבקבוקון (vial).

המיצוי הורחף ב 3 מ"ל מתנול ושימש למבחני הפרדה על פלטות TLC (TLC silica gel 60 F254 on) Aluminium של חברת MERC) בתערובות שונות של ממסים אורגניים. לאחר מספר גדול של נסיונות הגענו למסקנה כי התערובת של 95% כלורופורם ו- 5% מתנול הינה המתאימה ביותר כדי לקבל הפרדה יחסית טובה של החומרים בתערובת. הפרדת המרכיבים השונים במיצוי בנפח גבוהה בוצעה על ידי שימוש בקולונת Sephadex LH-20. מימדי הקולונה היו 20 ס"מ על 3 ס"מ (קוטר). החלקיקים הורחפו על פי הוראות הייצור במתנול 100% ונשטפו בכחמישה נפחים של מתנול לפני אקויליברציה בנוזל השטיפה שהורכב מ 95% כלורופורם ו- 5% מתנול. המיצוי הוטען על הקולונה ותערובת הכלורופורם: מתנול הוזרמה בעודף. סה"כ נאספו 40 פרקציות על פי מילוי של בקבוקונים בנפח 5.5 מ"ל כל אחת. דוגמא מהפרקציות השונות (כ 2 מיקרוליטר) הוטענו והופרדו על גבי פלאטות TLC לבחינת הרכב החומרים בהם ולשם איחוד פרקציות הזוהות בהרכב החומרים בהם. הרכב החומרים על הפלאטות נבחן על ידי חשיפתן לאור UV באורכי גל 365 ו-254 נ"מ. פרקציות זוהות אוחדו כך שבסופו של התהליך התקבלו 10 פרקציות המכילות הרכב חומרים שונה בכל אחת. בכדי לברר איזה מהחומרים בכל פרקציה הינו בעל פעילות ביולוגית כנגד גורמי המחלות המעניינים אותנו בחרנו לעבוד עם *Pythium ultimum* שהינו אואומיצט (דמוי פטרייה) שנמצא רגיש לפטרייה האנדופיטית ולחומרים המופרשים ממנה. בנוסף אורגניזם זה גדל בקלות ובמהירות על מצעי מזון ונוח לעבודה שתואר בהמשך.

עשר הפרקציות שהתקבלו הופרדו על פלאטות TLC כל פרקציה בנפרד בכמות קטנה (של כ 2 מיקרוליטר) בתערובות ממסים שונות כדי למצוא את התערובת הטובה ביותר להפרדה מירבית של החומרים המיצויים בפרקציה הנבדקת. לכשנמצאה לפרקציה מסוימת תערובת ההפרדה הטובה ביותר, בוצעה הפרדה בכמות גדולה יותר (כ-50 מיקרוליטר) על פלאטה גדולה יותר (3 ס"מ על 10 ס"מ). כל פס (חומר) שזוהה בשני אורכי הגל סומן בעזרת עפרון. הסיליקה מסביב לחומר שסומן גורדה מהפלאטה בעזרת ספטולה שטוחה כך שנוצרו "איים" של סיליקה המכילה את החומר המופרד בפרקציה. פיסת מצע מזון (PDA) מוצק בגודל זהה לאי הסיליקה (שנלקח מצלחת מזון PDA) הונחה על כל אי סיליקה ועל גבי המצע הונחה פיסת מצע מזון המכילה תפטיר חי של פיטיום. הרעיון במבחן זה הוא שמצע המזון סופג מהסיליקה שמתחתיו את החומרים הפעילים כך שאיי סיליקה המכילים חומרים פעילים, יעבירו את החומרים הללו למצע המזון ויעכבו את גידול הפטיום שהונח עליהם. לעומתם אי סיליקה שאינם מכילים חומרים פעילים הפטיום שמעליהם יגדל ללא הפרעה. הפלאטה נושאת הפיסות והאואומיצט הועברו לתא לח סגור, והושארו באינקובטור ב 25 מ"צ למשך שלושה ימים. לאחר יום אחד באינקובטור פיסות מצע המזון נבחנו מתחת למקרסקופ לגדילה של הפיטיום. בשל העובדה שאורגניזם זה גדל במהירות כבר לאחר 24 שעות ניתן היה לראות גידול על גבי אותן פיסות בהן החומר אינו מעכב את גידול הפיטיום או בביקורת על גבי סיליקה ללא חומרים. כל החומרים שעכבו גידול נרשמו ותועדו לאורך שלושת הימים של המבחן. הליך זה בוצע לכל 10 הפרקציות שנאספו. בסופו של תהליך התקבלה רשימה של 24 חומרים שגרמו לעיכוב גידול הפיטיום לאורך שלושה ימים לפחות. בשלב זה של העבודה היינו אמורים לעבור להפרדה ב HPLC אבל בשל העובדה שכל נסיונותינו להשתמש בממסים בעלי פולריות גבוהה כגון מתנול, מים ואצטוניטריל המשמשים בהפרדה בלחץ גבוה

(HPLC) הסתיימה בהסעת כל החומרים כשהם מאוד צפופים ובמהירות לקצה העליון של הפלאטה, הגענו למסקנה שהפרדה ב HPLC תהייה קשה מאוד ולכן עברנו להפרדה על גבי פלאטות TLC. שיטה זו הרבה פחות מדוייקת ואיטית. בנוסף היכולת לאסוף כמויות חומר גדולות מוגבלות ותלויות במספר ההרצות של כל פרקציה. לאחר כל הפרדה נגזרו החומרים שאובחנו כפעילים בבחינה הביולוגית מהפלאטה (הפלאטה עשויה מאלומניום דק כך שאפשר לגזור את החלק הרצוי בעזרת מספריים) והועברו לאלוציה של החומר במתנול. לפחות 10 הרצות בוצעו לכל פרקציה והמתנול הנושא את החומר שעבר אלוציה נודף לקבלת החומר הנקי. בשלב הבא כל חומר שנאסף הופרד שוב על גבי פלאטת TLC כדי לוודא את נקיון החומר. במקרים בהם התגלו מספר חומרים בוצעה הפרדה שוב לחומר ה"נקי" וכך הלאה עד לקבלת חומר שנראה בהפרדה על גבי הפלטה כנקי לחלוטין. החומר הנקי נבחן לפעילות ביולוגית כפי שתואר מעלה. רק חומרים נקיים שהראו פעילות ביולוגית משמעותית הועברו לאפיון כימי. מערך עבודה זה בוצע לכל 10 הפרקציות. פרקציה מספר 1, 9 ו 10 נמצאו כבר בתחילת העבודה כמכילות רק חומרים שאינם פעילים ביולוגית. מספר החומרים הפעילים שנמצאו בכל פרקציה מפורט בטבלה 1.

טבלה מספר 1. מספר החומרים הפעילים בכל פרקציה שהופרדה על קולונת LH-20

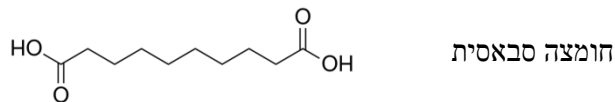
פרקציה מספר	מספר חומרים בפרקציה	מספר חומרים פעילים בפרקציה
1	11	0
2	13	3
3	10	5
4	10	5
5	10	2
6	11	3
7	8	3
8	7	3
9	5	0
10	1	0

במהלך העבודה, לאחר מספר הפרדות ונקיונות התברר לנו שישנם חומרים שנראו בהפרדות הראשונות כחומר יחיד אך נפרדו למספר חומרים שונים. גם במיקרים אלה החומרים השונים הופרדו, נאספו ונבחנו ביולוגית לפעילות. מ 24 החומרים הראשוניים רק 9 חומרים הושארו להמשך עבודה וזיהוי כימי.

זיהוי כימי של החומרים הפעילים.

הזיהוי הכימי בוצע על ידי דר. אלן גרבר מהמכון לקרקע ומים. החומרים הורצו ב GC/MS. במרבית הדוגמאות נמצא ש"החומר הנקי" הכיל יותר מחומר אחד בחלק מהמיקרים בגלל שהפיקים הכילו יותר מחומר יחיד המכשיר לא

יכול היה לקבוע מהי זהותם של חומרים אלה. בכל הפרקציות שנבדקו מלבד אחת נמצאו באופן עקבי שני חומרים באופן בולט: החומר האחד זוהה כחומצה Hexadecanoic (Palmitic acid $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$) והשני כחומצה Octadecanoic (Stearic acid $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$) שתי חומצות אלה הינן חומצות שומן מאוד נפוצות בטבע. הראשונה מצויה בבעלי חיים, צמחים ומיקרואורגניזמים שונים וביחוד בשמן המופק מדקלים. החומצה השנייה גם היא חומצת שומן מאוד נפוצה בטבע ומשמשת בתעשיית הקוסמטיקה ובעיקר בסבונים ושמפו. חומר שלישי שנמצא באחת הפרקציות היה אסתר בשם Bis(2-ethylhexyl) sebacate המשמש כפלסטיסיידר. היות וחומר זה הינו אסתר של חומצה Sebacic ((HOOC)(CH₂)₈(COOH)) הוספנו גם את החומצה לניסויים שלנו. חומצה זו משמשת בתעשייה במגוון שימושים ובעיקר בתעשיית הנרות, הקוסמטיקה וכחומרי סיכה.



כל החומרים ידועים כחומרים שאינם רעלניים או מסוכנים. מסריקת הספרות מתברר שבחינת השפעת חומצה פלמטית וחומצה סטרית על גידול פטריות לא נמצאה השפעה בעלת משמעות (Lee et al. 1999) חומצות ארוכות (C18) שנבחנו לפעילות כנגד חיידקים נמצאו בחלקן פעילות ביולוגית כנגד חיידקים גרם חיוביים אך לא כנגד גרם שלילים (Galbraith 1971). החיידק קלויבקטר משיגנסנס הינו חיידק גרם חיובי. לאור תוצאות האנליזה שהתקבלו מה GC רכשנו ארבעה חומרים מסיגמא:

Palmetic acid (sigma number 27734)

Stearic acid (sigma number 175366)

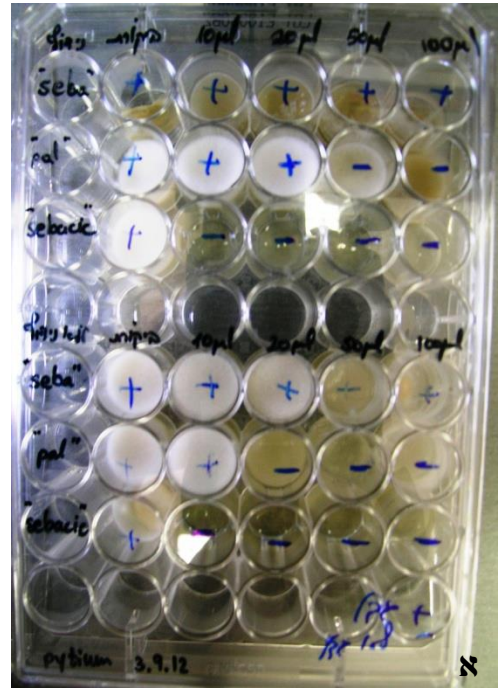
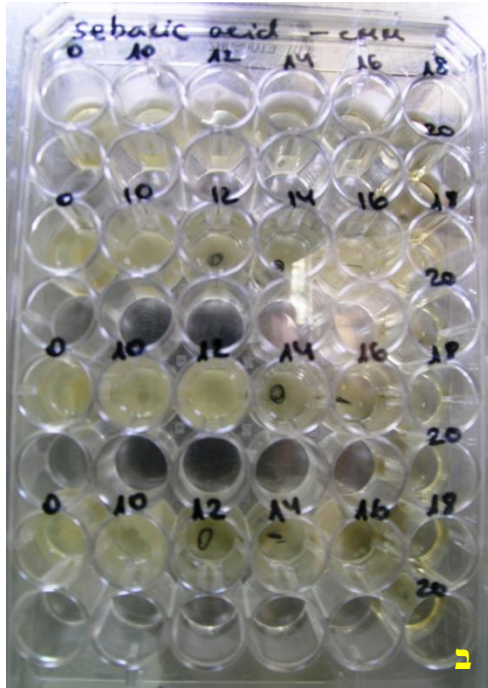
Bis(2-ethylhexyl) sebacate (sigma number 84822)

Sebacic acid (sigma number 84809)

שלושת החומצות הגיעו כאבקות והומסו באתנול לריכוז של 250 mole/liter. האסטר הגיע כנוזל.

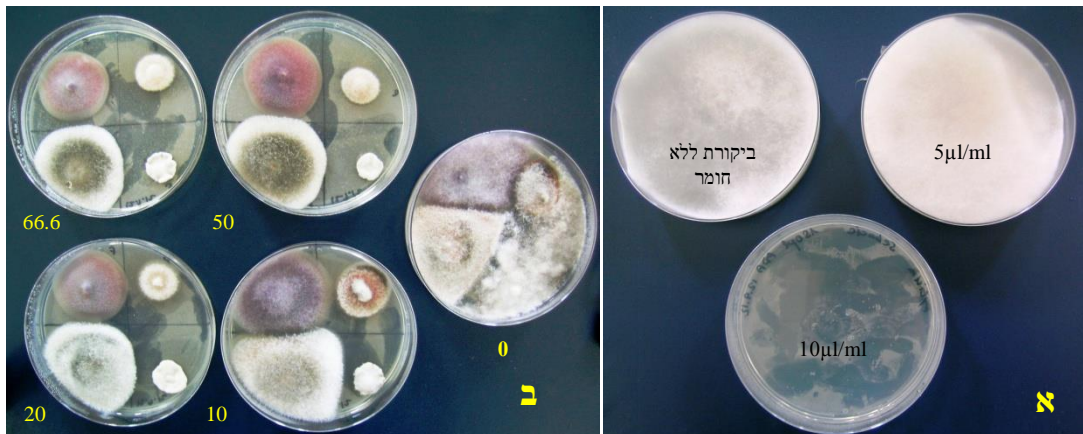
כל החומרים נבחנו לפעילות ביולוגית במבחני בארות ובצלחות מצע מזון מוצק.

מבחני הגדילה בוצעו על שניים מהפטוגנים: *Pythium ultimum* ו קלויבקטר משיגנסנס. שני פתוגנים אלה דמוי הפטרייה (אואומיצט) והחיידק הגרם חיובי גדלים על מצעי מזון בקלות יחסית בעוד הפתוגן השלישי *Phytophthora* sp. הגורם למחלת הכימסון אינו גדל טוב על מצעי מזון ודורש גידולו על הצמח עצמו (או עלים מנותקים). את המבחנים ביצענו בשני אופנים: על מצעים נוזליים (מבחן איכותי- תמונה 1) ועל מצעי מזון מוצקים (מבחנים כמותיים- תמונה 2).



תמונה 1: מבחני פעילות חומרים במצעים נוזליים

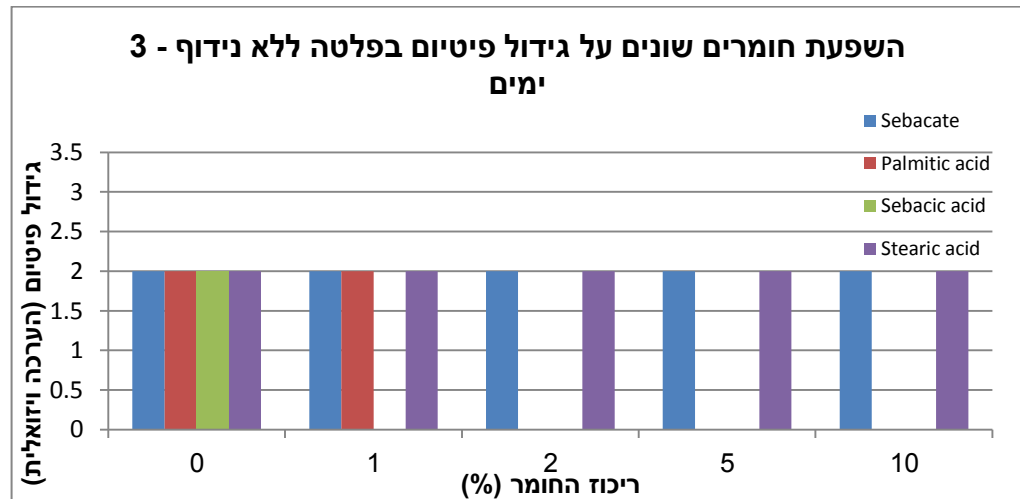
- א. בחינת השפעת החומרים השונים על גידול פטיום בכמויות חומר שונים
- ב. בחינת השפעת חומצה סאבאסית בכמויות שונות על גדילת קלויבקטר משיגנסס + מסמן גדילה של בריכוז הנבדק - מסמן עיכוב גידול בריכוז הנבדק



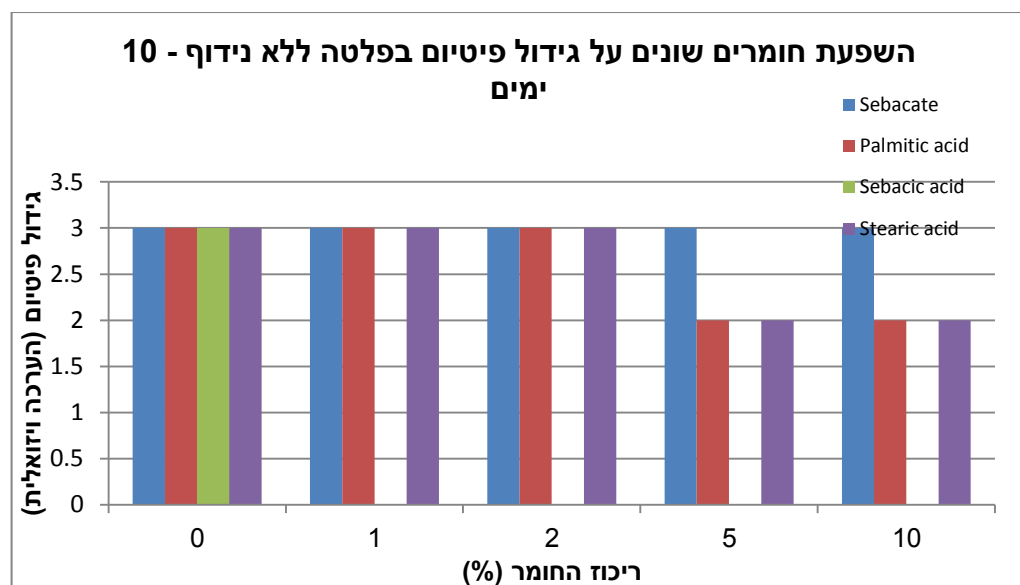
תמונה 2. מבחני פעילות החומרים על מצעי מזון מוצקים

- א. השפעת חומצה סאבאסית על גדילת פטיום במצע PDA. הכמויות הינן מסטוק בריכוז 250 מילימולר.
- ב. בחינת השפעת חומצה סאבאסית על גדילת פטריות שונות (משמאל עם כיוון השעון: *Fusarium sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Sclerotinia sp.*, *Phoma tracheiphila*, המספרים לצד הצלחות מייצגים את הכמות במיקרוליטר למ"ל מצע מוצק.

מבחני הגדילה על מצעים נוזליים ומוצקים בוצעו בשלב ראשון בכמויות שונות של ארבעת החומרים לבחינת גדילת פטיום וקלויבקטר. מתוך מבחנים אלה התבררו הכמויות של החומרים השונים המשפיעות על גידול שני הפטוגנים. הגדילה הוערכה לאחר שלושה ימים ולאחר 10 ימים (גרף 2 וגרף 3). החומרים השונים הוספו בשני אופנים לפלטות הגידול: החומר הוסף כנוזל ישירות למצע המזון (ביקורת שלילית במיקרה זה היה אתנול נקי). דרך שניה היתה על ידי הוספת הכמות הרצויה לבאר ריקה, נידוף האתנול כך שהחומר נשאר בתחתית הבאר והוספת 1 מ"ל מצע לבארות. הפטיום הוסף כפלאג הנושא את תפטיר הפטרייה למצע המזון.



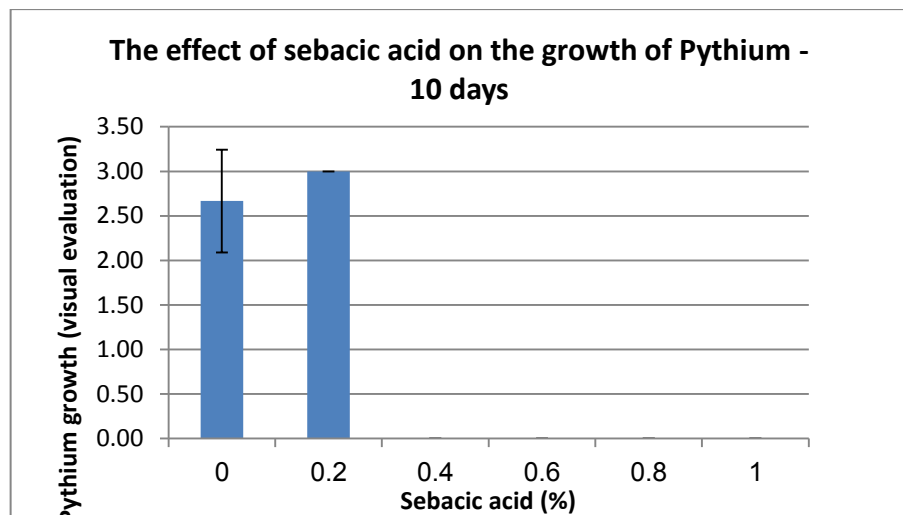
גרף 2: השפעת החומרים השונים על גידול פיטיום במצע נוזלי לאחר שלושה ימים ללא נידוף
 ריכוז החומר נתון ביחס לכמות המצע. נפח סופי של מצע בבאר הינו 1 מ"ל כלומר 1% הינם 10, 20, 50 ו-100 מיקרוליטר חומר למ"ל מצע בהתאמה.



גרף 3: השפעת החומרים השונים על גידול פיטיום במצע נוזלי לאחר עשרה ימים ללא נידוף

ריכוז החומר נתון ביחס לכמות המצע. נפח סופי של מצע בבאר הינו 1 מ"ל כלומר 1%, 2%, 5%-10% הינם 10, 20, 50 ו-100 מיקרוליטר חומר למ"ל מצע בהתאמה.

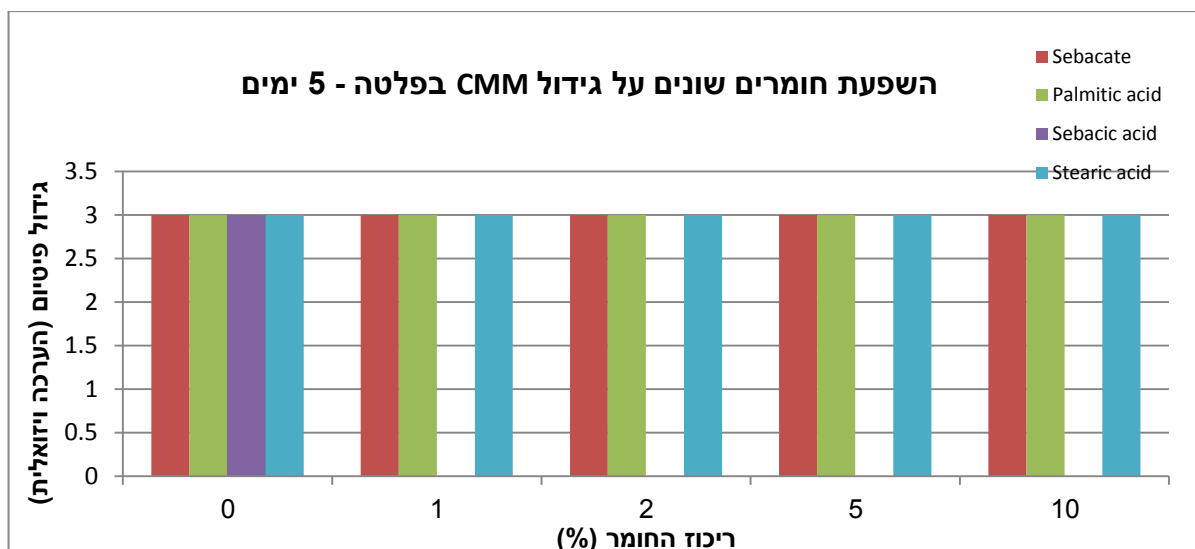
מהתוצאות שהתקבלו במבחנים אלה התברר כי לחומצה סטארית ולאסטר הנבחן אין השפעה על גידול הפטיום גם לא לאחר 10 ימים באף אחד מהכמויות שנבחנו. לחומצה פלמיטית נמצאה השפעה על גידול הפטיום כבר בריכוז של 2% לאחר שלושה ימים אך השפעה זו הופסקה לאחר עשרה ימים. לאחר עשרה ימים ניתן היה לראות השפעה של החומצה הפלמיטית והסטרית בריכוז של 5 ועשרה אחוז לעומת הביקורת. השפעה זו התבטאה בדיכוי של כ-33% גידול. באופן מאוד בולט כבר מריכוז של 1% לאורך כל הניסוי השפעתה של החומצה הסבאסית היתה חד משמעית והדיכוי בגידול הפטיום היה בכל הריכוזים 100% (גרף 2 וגרף 3). תוצאות זהות התקבלו גם בניסוי בו בוצע הוספה של החומרים הנבדקים לבארות ונידוף האתנול לפני הוספת מצע המזון והפטרייה לבאר (תוצאות לא מוצגות). בכדי לבחון מהו הגבול התחתון של השפעת החומצה הסבאסית על גידול הפטיום ביצענו מבחן גידול בריכוזים נמוכים מ-1% על גידול פיטיום. התוצאות (גרף 4) מראות כי הכמות הנמוכה ביותר שמעכבת את גידול הפטיום במצע נוזלי הינה 0.4% מסטוק של 250 מילימולר או 4 מיקרוליטר למ"ל.



גרף 4: השפעת חומצה סבאסית על גדילת פיטיום במצע נוזלי

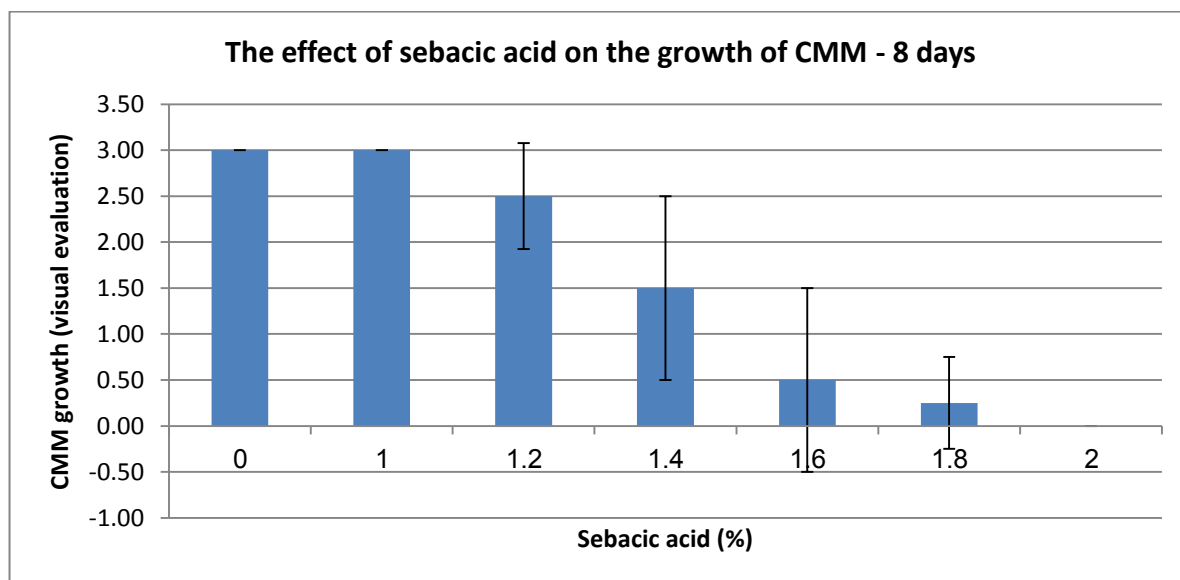
ריכוז החומר נתון ביחס לכמות המצע. נפח סופי של מצע בבאר הינו 1 מ"ל כלומר 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% ו-1% הינם 2, 4, 6, 8 ו-10 מיקרוליטר חומר למ"ל מצע בהתאמה.

מבחנים דומים בוצעו לבחינת השפעת ארבעת החומרים על גידול קלויבקטר (CMM) במצע נוזלי. לכל באר במבחן הוספו 10 מיקרוליטרים של חיידק בריכוז של 10^6 cfu.



גרף 5: חומרים שונים על גידול קלויבקטר משיגננסס במצע נוזלי לאחר חמישה ימים. ריכוז החומר נתון ביחס לכמות המצע. נפח סופי של מצע בבאר הינו 1 מ"ל כלומר 1%, 2%, 5% ו-10% הינם 10, 20, 50 ו-100 מיקרוליטר חומר למ"ל מצע בהתאמה.

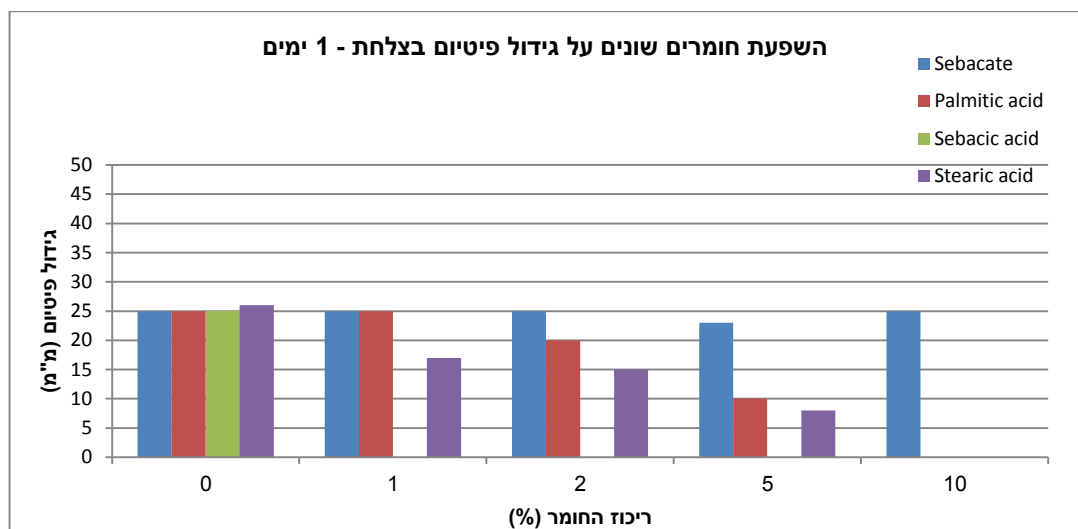
במבחנים אלה נמצא כי לאחר חמישה ימים אין השפעה לאף אחד מהחומרים שהוספו מלבד חומצה סבאסית שמדכאת את גידולו של החיידק כבר בריכוז של 1% במצע (1 מיקרוליטר למ"ל).



גרף 6: בחינת השפעת חומצה סבאסית בכמויות קטנות על גדילת החיידק קלויבקטר משיגננסס לאחר 8 ימים. ריכוז החומר נתון ביחס לכמות המצע. נפח סופי של מצע בבאר הינו 1 מ"ל כלומר 1%, 1.2%, 1.4%, 1.6%, 1.8 ו-2% הינם 01, 12, 14, 16, 18 ו-20 מיקרוליטר חומר למ"ל מצע בהתאמה. בבחינת השפעת כמויות קטנות בטווח שבין 2 מיקרוליטר למיקרוליטר אחד למ"ל מצע על גדילת החיידק במצע נוזלי לאחר שמונה ימים (גרף 6) ניתן לראות שבריכוז של 1.4% שהם 14 מיקרוליטר למ"ל מצע ישנה ירידה

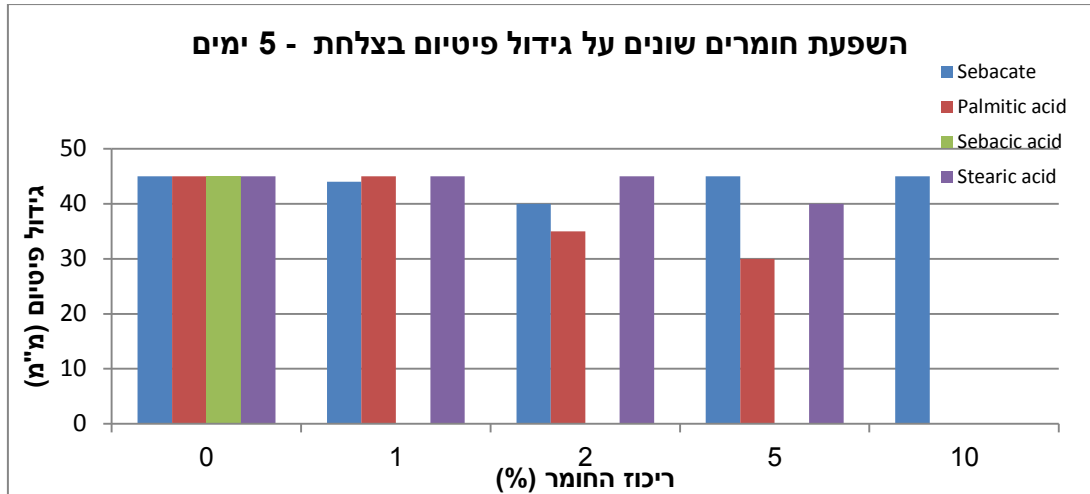
בגידול החיידק במצע. גדילת החיידק במבחנים אלה במצעים נוזלים הוערכה על פי סקלה הנעה בן אין גידול כלל - 0, גידול מועט-1, גידול ברמה בינונית-2 וגידול זהה לביקורת ללא חומרים-3.

בכדי לקבל תוצאות כמותיות ולא רק איכותיות בוצעו מבחני השפעת החומרים על גידול פטיום וקלויבקטר במצעי מזון מוצקים. כמו במבחנים שבוצעו במצעים נוזליים, גם במצעים המוצקים השפעתו של האסטר היתה זניחה על גידול הפטיום בצלחות בהשוואה לביקורת. לאחר יום אחד בו גדל הפטיום בצלחות הביקורת למושבא בקוטר 25 מ"מ החומצה הפלמיטית דיכאה את גידולו ב-20% בריכוז של 2%, ב 60% בריכוז של 5% וב 100% בריכוז של 10%. החומצה הסטרית דיכאה את גידולו של הפטיום ב 32% מהביקורת ב 1%, ב 40% ב 2%, ב 72% ב 5% וב 100% גידול ב 10% (גרף 7).



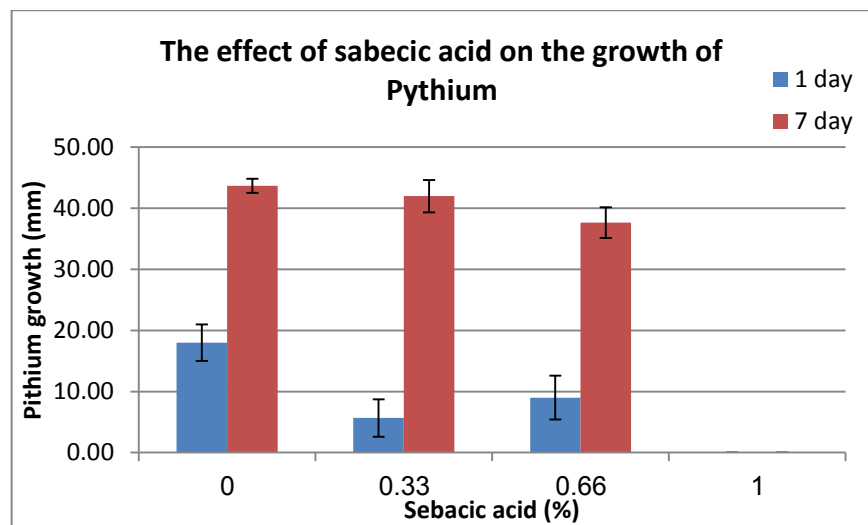
גרף 7. השפעת ארבעת החומרים השונים על גידול פטיום בצלחת מצע מזון מוצק לאחר יום אחד. גדילת האוואמיצט נמדדה במ"מ ממרכז הפלאג. ריכוז החומרים הינו באחוז חומר לנפח מצע מזון.

לאחר חמישה ימים רמת הדיכוי ירדה כך שלאחר חמישה ימים בו גדל הפטיום בצלחות הביקורת למושבא בקוטר 45 מ"מ (צלחת פטרי 90 מ"מ מלאה) החומצה הפלמיטית דיכאה את גידולו ב-22% בריכוז של 2%, ב 33% בריכוז של 5% וב 100% בריכוז של 10%. החומצה הסטרית דיכאה את גידולו של הפטיום ב 11% מהביקורת ב 10% בלבד (גרף 8). גם לאחר יום אחד וגם לאחר חמישה ימים השפעת החומצה הסבאסית היתה מריכוז של 1% ומעלה ברמה של 100% דיכוי גדילה.



גרף 8. השפעת ארבעת החומרים השונים על גידול פיטיום בצלחת מצע מזון מוצק לאחר חמישה ימים. גדילת האוואמיצט נמדדה במ"מ ממרכז הפלאג. ריכוז החומרים הינו באחוז חומר לנפח מצע מזון.

בבחינת השפעת כמויות קטנות של החומצה הסבאסית נמצא כי לאחר יום אחד ולאחר 7 ימים היתה השפעה על גידול הפטריה בריכוזים של 0.33 ו-0.66 אחוז, אבל השפעה זו היתה יחסית נמוכה ודיכווי גדילה של 100 התקבל רק ב 1% של החומר במצע.



גרף 9: השפעת כמויות קטנות של חומצה סבאסית על גידול פיטיום במצע מוצק לאחר יום אחד ושבעה ימים. גדילת האוואמיצט נמדדה במ"מ ממרכז הפלאג. ריכוז החומרים הינו באחוז חומר לנפח מצע מזון.

בבחינת השפעת החומרים השונים על גידול חיידק הקלויבקטר במצעים מוצקים (LB-Agar) נמצאו תוצאות דומות לאלה שהתקבלו במצעים נוזליים. גם במבחנים אלה לחומצה הפלמטית, הסטרית ולאסתר לא היתה השפעה כלל על גידול החיידק והתקבל דשא חיידקים בצלחות הבדיקה בכל הריכוזים שנבחנו (טבלה 2). 100 מיקרוליטר תרחיף חיידקים בריכוז של 10^4 cfu נזרעו על כל צלחת בריכוזים השונים. החומצה הסבאסית מנעה את גדילתו של החיידק בריכוז של 20 מיקרוליטר למ"ל ויותר. בבחינת כמויות נמוכות יותר על גדילתו של החיידק במצעי

המזון אפשר היה לראות ירידה בכמות החיידקים כבר בריכוז של 16 מיקרוליטר למ"ל. כאשר בריכוז של 18.6 מיקרוליטר למ"ל לא גדלו חיידקי הקלויבקטר כלל.

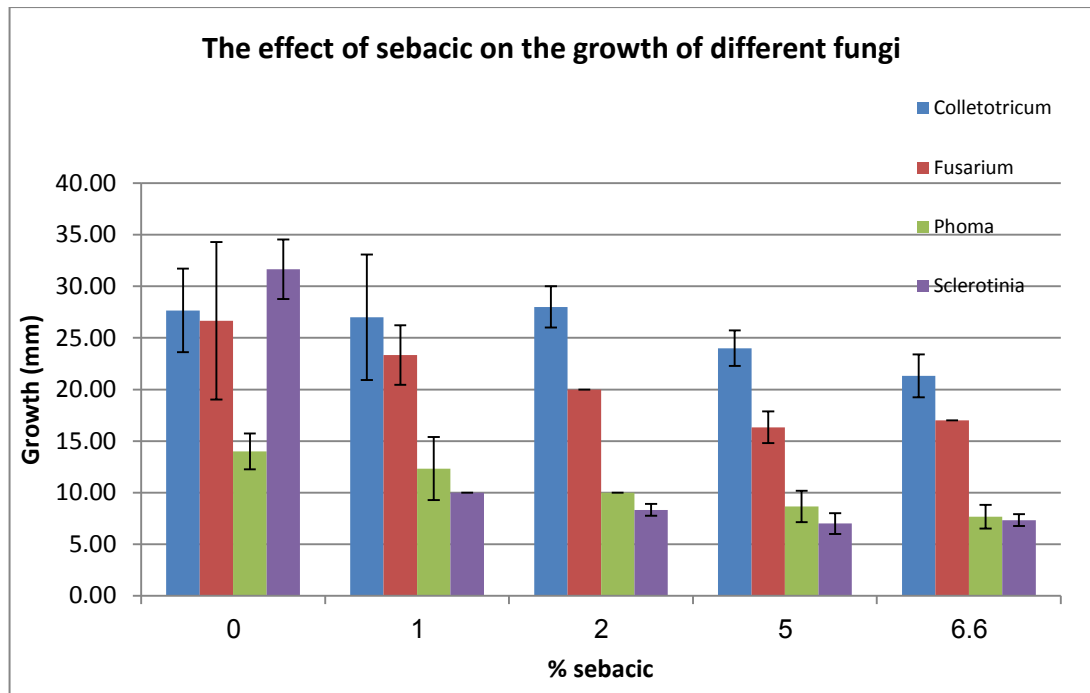
טבלה 2: גידול חיידק הקלויבקטר בנוכחות החומרים השונים בכמויות שונות על מצע מזון מוצק

66.6µl/ml	50µl/ml	20µl/ml	10µl/ml	החומר/ ריכוז
>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	Sebacate
>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	Palmitic acid
>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶	Stearic acid
0	0	0	>10 ⁶	Sebacic acid

Sebacic acid	
cell/plate	ריכוז
>10 ⁶	13.3µl/ml
>10 ⁶	14.6µl/ml
>10 ⁵	16µl/ml
>10 ⁴	17.3µl/ml
0	18.6µl/ml
0	20µl/ml

השפעת החומצה הסבאסית על גדילת פטריות אחרות במצע מוצק

השפעתה של החומצה הסבאסית על גדילתן של פטריות אחרות נבחנה בריכוזים שונים. מטרת בחינה זו היתה לראות האם הפעילות הביולוגית כנגד אואומיצטים שנמצאה לחומצה זו הינה אכן ספציפית או שאולי כאשר החומר הפעיל הינו חומר נקי הוא יפעל גם כנגד פטריות אחרות.



גרף 10: השפעת חומצה סבאסית על פטריות שונות במצע מזון מוצק

כפי שניתן לראות מתוצאות ניסוי זה אין לחומצה הסבאסית השפעה על גידולה של הפטריה *Colletotricum* sp. פטריית ה- *Fusarium* sp. הושפעה בריכוזים של 2, 5 ו-10%. השפעה זו התבטאה בדיכוי של כ-23%, 38 ו-38% בהתאמה. במקרה של הפטריה *Phoma tracheiphila* רואים ירידה בגודל המושבה ככל שעולים בריכוז במצע. במצע המכיל 2% חומצה ישנה ירידה של 28 אחוז בגידול. בריכוז של 5% ו-6.6% ישנה ירידה של 57 אחוז בגידול. ההשפעה הגדולה ביותר שנצפתה היתה על הפטריה *Sclerotinia* sp. כבר בצלחות בהם יש 1% של החומצה היתה ירידה של 69 אחוז בגידול הפטריה. דיכוי זה נשמר ואף גדל במעט כשבשני אחוז היה ירידה בגידול של 75 אחוז ובחמישה ו-6.6 אחוז 78%. היות ופטריות אלה לא הושפעו ממיצוי הפטריה המקורי אפשר להניח שאכן טווח הפעילות של החומצה הסבאסית כחומר נקי הינו גדול יותר מזה שהתגלה בסריקה הראשונית בעזרת הפטרייה עצמה או המיצוי של החומרים המופרשים ממנה.

במהלך העבודה עלתה השאלה האם יתכן והחומצה מעצם היותה חומצה משנה את חומציות המצעים או הסביבה בה היא נמצאת ומעצם כך מונעת או פוגעת ביכולתם של הפתוגנים שנבחנו לגדול. בדקנו את חומציות המצעים בהם השתמשנו לפני ואחרי הוספת החומצה הסבאסית ולא מצאנו שינויים בחומציותם, לא ברמה שיכולה להשפיע על גידול הפתוגנים כפי שהיא מתבטאת בתוצאות שלנו.

דיון

חומצה סבאסית הינה חומצה שומנית קטנה, בעלת עשרה פחמנים, נפוצה בטבע. כפי שהוזכר לא ידוע בספרות על טוקסיות של חומצה זו או מסוכנות לצמחים ובעלי חיים. החומצה מתגלה בניסויים שלנו כבעלת פעילות חזקה מאוד כנגד לפחות שני אואומיצטים וחיידק גרם חיובי אחד. לא ברור לנו מהו מנגנון הפעולה שלה על הפתוגנים אנו יכולים רק לשער שבל היותה חומצה שומנית היא יכולה לחזור לממברנה של המיקרואורגניזם ולגרום

לעירעור המברנה או לחילופין לחזור אל תוך התא ולפעול בציטופלסמה. השערות אלה אינן מבוססות על עובדות ומהוות ספקולציות שיש לבחון בעתיד. במיבחן ציטוטוקסיות שבוצע על ידי ריסוס ריכוזים שונים של החומצה (10, 20, 50, 100, 300, 600, 800 ו 1000 מיקרוליטר ל מ"ל) על צמחוני עגבניה לא נצפתה כל תגובה של הצמח לחומר.

התוצאות שלנו מעלות את האפשרות להשתמש בחומר זה שהינו טבעי כמדביר לפחות לשלושת גורמי המחלה המוצעים בהצעה זו. אפשרות זו כמובן עדיין רחוקה מאוד מיישום שכן יש לבצע מבחנים בהם נבדוק את השפעת החומר על הדבקות והתפתחות המחלות המוזכרות לאורך זמן תוך יישום מספר אפליקציות של החומר. גם בניסויים שלנו ראינו כי יישום יחיד של המיצוי הצליח להפחית את עוצמת התסמינים כל עוד לא התרחשה הדבקה נוספת של הצמחים. בניסויים בהם אנו משערים שהתרחשה הדבקה שניה בשל קרבת הצמחים האחד לשני לאורך זמן ראינו כי תסמינים של המחלה, במקרה זה הכיב הבקטריאלי, נמצאו גם בביקורות וגם בטיפולים ולמרות זאת ניתן היה לראות הבדלים בן צמחים שלא טופלו לכאלה שטופלו במיצוי הפטרייה. בחינת השפעת החומצה הסאבסית על התפתחות התסמינים לאורך זמן הינו צעד חשוב בבחינת חומר זה אבל אינה מספיקה. כך לדוגמה במקרה של קלויבקטר משיגננס, החיידק יכול לחיות ולהתרבות בצמח מבלי לגרום להופעת תסמינים. ניסויים בהם תבדק נוכחותו של החיידק בתוך הצמח עם ובלי יישום של החומצה הינם הכרחיים במקרה זה.

בעיה נוספת הינה העובדה שחומצה זו אינה מסיסה במים ביעילות אלה באתנול או ממסים אורגנים אחרים. שימוש באתנול כממס נעשה בשל העובדה שחומר זה על פי הספרות מתמוסס במים עד לריכוז של 250 מיקרוגרם למ"ל היות ובתחילת העבודה לא ידענו מהם הריכוזים היעילים המסנו את החומר לריכוז של 250 מילימולר שהינם כ 50 מיליגרם (50000 מיקרוגרם) למ"ל. לאור העובדה שהריכוז היעיל הינו כ 20-15 מיקרוליטר למ"ל בריכוז של 250 מילימולר שהם כ 1 מ"ג למ"ל ובכדי שניתן יהיה להשתמש בחומר זה בהיקף חקלאי יש למצוא דרך לגרום לחומצה זו להתמוסס במים ביעילות גבוהה יותר. אחת האפשרויות היא ליצור מלח של חומצה זו. יש לבחון אפשרות זו בעזרתם של כימאים אורגנים. בהנחה שאפשר יהיה ליצור מלח של חומצה זו יהיה צורך לבחון את פעילותו של המלח שכן יתכן ושינוי זה יבטל את פעילותה הביולוגית של החומצה במצבה המסיס במים. לראיה מולקולה המבוססת על החומצה כאסתר Bis(2-ethylhexyl) sebacate, נבחן בעבודה זו לא הראה פעילות ביולוגית כלל כנגד הפתוגנים שנבחנו.

לסיכום, בתקופת הדוח בחנו את פעילותו של מיצוי הפטרייה על הופעת תסמיני מחלת הכיב הבקטריאלי בצמחוני עגבניה, בודדנו וזיהינו מספר חומרים ממיצוי הפטרייה. בחנו את פעילותם של חומרים אלה על שניים ממחוללי המחלה בעגבניות במבחני מעבדה והראנו כי לאחד החומרים Sebacic acid ישנה פעילות ביולוגית חזקה כנגד גורמי מחלות אלה.

השלב הבא המתבקש הינו בחינת השפעת החומצה שנמצאה על התפתחות המחלות על צמחי עגבניה הן במעבדה והן בחממות גידול. בחינה זו תבוצע על ידינו בעתיד.

Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M. and Thompson, J. K. 1971. Antibacterial Activity of Long Chain Fatty Acids and the Reversal with Calcium, Magnesium, Ergocalciferol and Cholesterol. *Journal of Applied Microbiology* 34:803-813

Lee, S.,S., Ha, J., K., Kim, K., H. and Cheng, K., J. 2000. Effect of grass lipids and long chain fatty acids on cellulose digestion by pure cultures of rumen anaerobic fungi, *Piromyces rhizinflata* B157 and *Orpinomyces joyonii* SG4. *Asian-australasian journal of animal sciences* 13:23-30

3. סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת). שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<p>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <p>1. בירור השפעת ריסוס מיצוי החומרים המופרשים על ידי הפטריה על הדבקות והתפתחות מחלת הכיב הבקטריאלי בעגבניות. 2. בידוד, זיהוי ואפיון החומרים הפעילים במיצוי.</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</p> <p>השפעת ריסוס המיצוי מהפטריה על צמחי עגבניה והדבקותם בחיידק מחולל מחלת הכיב הבקטריאלי נבחן. נמצא כי לריסוס הצמחים בזמן ההדבקה, 16 שעות ו 24 שעות אחרי ההדבקה היתה השפעה על הופעת תסמיני מחלה בצמחים עד שבועיים לאחר ההדבקה בחיידק. מיצוי החומרים הנמצאים במצע הגידול של הפטרייה לאחר שבועיים גידול עבר אנליזה בה הופרדו החומרים השונים במיצוי וכל חומר נבדק לפעילות ביולוגית מתוך 86 חומרים שונים בסריקה ראשונית 21 הראו פעילות מתוכם 9 נוקו ושלושה זוהו. ארבע חומרים (אחד-חומצה סבסאסית נבחן בשל היות אחד החומרים שזוהו נגזרת שלו) נבחנו לפעילות ביולוגית במבחני מעבדה מתוכם אחד נמצא פעיל כנגד האאומיצט פטיום והחיידק קלויבקטר.</p>
<p>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.</p> <p>נמצא חומר הנחשב לידידותי יותר מכך כמולקולה המשמשת במוצרי קוסמטיקה ואחרים המאושרים לשימוש בבני אדם ובעלי חיים כבעל פעילות ביולוגית חזקה כנגד גורמי מחלות בעגבניה. יש להמשיך ולבחון את האפשרות להשתמש בחומר זה כחומר הדברה ירוק ידידותי כנגד מחלות אלה בתנאי שדה. ניסויים אלה ימשכו וכבר מבוצעים שלא במסגרת תוכנית זו שהסתיימה. מטרות המחקר לשנה זו הושגו.</p>
<p>הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר.</p> <p>יש להמשיך ולבחון את החומר שנמצא פעיל בניסויים בסדר גודל גדול יותר מחוץ למעבדה (בתי גידול ובתי רשת). האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.</p>
<p>הרצאה במסגרת פגישת Cost של האיחוד האירופי הציגה באופן חלקי מאוד את התוצאות שהתקבלו בשנת המחקר הראשונה והשנייה בלבד (יוני 2012 ריימס צרפת). במצגת זו הוצגו התוצאות כדוגמא להתפתחות שלא על פי הצפוי במחקר המערב אנדופיטים ושימוש בהם כבקרים ביולוגיים למחלות צמחים. תוצאות השנה האחרונה לא הוצגו. אנו בוחנים אפשרות להגנת זכויות בנושא השימוש בחומר שנמצא כפעיל ולכן הפצת המידע תעוכב עד לבירור הפוטנציאל ביחידת קידום.</p>
<p>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</p>
<p>← רק בספריות תוצאות שנה ראשונה ושניה (בכפוף להמלצת יחידת קידום)</p>
<p>← ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p>
<p>← חסוי – לא לפרסם את תוצאות השנה השלישית (בעצם את הדוח המסכם)</p>

